VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN

PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

WEICKMANN & WEIG Postfach 860 820 81635 München ALLEMAGNE

WEICKMANN & WEICKMANN & Weickmann

1 9. JULI 2004

Frist Patentanwälte PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum

(TagMonatUahr)

16.07.2004

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

30850P WO

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09625

Internationales Anmeldedatum (TagMonatUahr) 29.08.2003

Prioritätsdatum (TagMonat/Jahr)

30.08.2002

Anmelder

DEGUSSA AG et al.

- Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- Eine Kopie des Berichts wird gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- Auf Wunsch eines ausgewählten Amts wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

lst einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Der Anmelder wird auf Artikel 33(5) hingewiesen, in welchem erklärt wird, daß die Kriterien für Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit, die im Artikel 33(2) bis (4) beschrieben werden, nur für die internationale vorläufige Prüfung Bedeutung haben, und daß "jeder Vertragsstaat (...) für die Entscheidung über die Patentfähigkeit der beanspruchten Erfindung in diesem Staat zusätzliche oder abweichende Merkmale aufstellen" kann (siehe auch Artikel 27(5)). Solche zusätzlichen Merkmale können z.B. Ausnahmen von der Patentierbarkeit, Erfordernisse für die Offenbarung der Erfindung sowie Klarheit und Stützung der Ansprüche betreffen.

Name und Postanschrift der mit der Internationalen Prüfung beauftragten Behörde

9)

Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 Bevollmächtigter Bediensteter

Rauf, A

Tel. +49 89 2399-7548



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESE

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 19 JUL 2004

						WIPO BCT
			Anmelders oder Anwalts	WEITERES VORGE	HEN siehe Mitteilun	g über die Übersendung des internationalen
3085	50P W	0			vorlautigen Pro	ifungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Intern	ational	es Akt	enzeichen	Internationales Anmelded	latum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (TagMonatUahr)
. • .	ÆP 0			29.08.2003		30.08.2002
Intern	ational	e Pate	ntklassifikation (IPK) oder	nationale Klassifikation und	I IPK	
C12	N9/16					
Anme	elder					
DEG	SUSS	A AG	et al.			
_						
1.	Diese	er inte	rnationale vorläufige P	rüfungsbericht wurde vo	n der mit der internati	onalen vorläufigen Prüfung
	beau	ftragte	en Behörde erstellt und	wird dem Anmelder gen	пар Алікеі 36 ирегті	nieit.
}						
2.	Diese	er BEI	RICHT umfaßt insgesa	mt 6 Blätter einschließlic	ch dieses Deckblatts.	
	-		1 Banan dana Barda	ha ANII ACENI bair dabai	handelt as sich um E	Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen
	×		der Zeichnungen die	aoëndert wurden und die	sem Rericht zuarund	le liegen, ungløder Blatter mit vor gleser
1		Behö PCT	orde vorgenommenen E	Berichtigungen (siehe Re	gel 70.16 und Absch	nitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum
	D'-		<i>).</i> agen umfassen insgesa	amt 3 Blätter		
	Dies	e Ania	agen unnassen msgesa	anto biatter.		
	Dia-	or Po	richt enthält Angaben z	u folgenden Punkten		
3.	Dies					
	l 		Grundlage des Besch	neids		
	ii		Priorität	a Gutachtana ühar Nauh	oit arfindarischa Täti	igkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
	III IV		Keine Erstellung eine Mangelnde Einheitlich		en, emmensone ran	
	V	⋈	Bogründete Feststelli	ung nach Begel 66.2 a)ii') hinsichtlich der Neu	heit, der erfinderischen Tätigkeit und der
	٧	انسا	gewerblichen Anwen	dbarkeit; Unterlagen und	Erklärungen zur Stüt	tzung dieser Feststellung
1	VI		Bestimmte angeführte			
	VII			er internationalen Anmel		
	VIII		Bestimmte Bemerkur	ngen zur internationalen	Anmelaung '	
					Datum der Fertigstellu	ing dieses Berichts
Datu	Datum der Einreichung des Antrags				Datum der Fertigstent	and disease monaine
05.02.2004					16.07.2004	
00.02.2007						
Nan	ne und	Posta	nschrift der mit der interna	ationalen Prüfung	Bevollmächtigter Bed	iensteter
bea	uftragte		nörde Iropälsches Patentamt			
1	9))	n-	80298 München ıl. +49 89 2399 - 0 Tx: 523	3656 epmu d	Griesinger, I	
_	<u> ਭਾ</u>	. Fa	x: +49 89 2399 - 4465	- .	Tel. +49 89 2399-759	omes onno solo

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09625

 Grundlage des Be 	erichts
--------------------------------------	---------

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)):

	Bes	chreibung, Seiten		
	1, 4	, 5, 7-15	in der ursprünglich eing	ereichten Fassung
	2, 3	, 6	eingegangen am 09.06	.2004 mit Schreiben vom 09.06.2004
	Ans	sprüche, Nr.	•	•
	1-17	1	in der ursprünglich eing	ereichten Fassung
2.	die i	internationale Anmeld	: Alle vorstehend genannten Be lung eingereicht worden ist, zur s anderes angegeben ist.	standteile standen der Behörde in der Sprache, in der Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern
	Die eing	Bestandteile standen gereicht; dabei handel	der Behörde in der Sprache: It es sich um:	zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache
		die Sprache der Übe (nach Regel 23.1(b))	rsetzung, die für die Zwecke de	r internationalen Recherche eingereicht worden ist
		die Veröffentlichungs	ssprache der internationalen An	meldung (nach Regel 48.3(b)).
		die Sprache der Übe worden ist (nach Reg	rsetzung, die für die Zwecke de gel 55.2 und/oder 55.3).	r internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht
3.	Hin: inte	sichtlich der in der inte rnationale vorläufige l	ernationalen Anmeldung offenba Prüfung auf der Grundlage des	arten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist di Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:
		in der internationaler	n Anmeldung in schriftlicher For	m enthalten ist.
		zusammen mit der ir	nternationalen Anmeldung in co	mputerlesbarer Form eingereicht worden ist.
		bei der Behörde nac	hträglich in schriftlicher Form ei	ngereicht worden ist.
		bei der Behörde nac	hträglich in computerlesbarer Fo	orm eingereicht worden ist.
		Die Erklärung, daß o Offenbarungsgehalt	las nachträglich eingereichte sc der internationalen Anmeldung	hriftliche Sequenzprotokoll nicht über den im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
		Die Erklärung, daß d Sequenzprotokoll en	lie in computerlesbarer Form er itsprechen, wurde vorgelegt.	fassten Informationen dem schriftlichen
4.	Auf	grund der Änderunge	n sind folgende Unterlagen fortç	gefallen:
		Beschreibung,	Seiten:	
		Ansprüche,	Nr.:	
		Zeichnungen,	Blatt:	

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09625

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N) Ja: Ansprüche 11

Nein: Ansprüche 1-10

Erfinderische Tätigkeit (IS) Ja: Ansprüche

Nein: Ansprüche 1-11

Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) Ja: Ansprüche: 1-11

Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT



Antrag auf Korrektur von "offensichtlichen Schreibfehlern"

Keine der beantragten Korrekturen ist gemäß Regel 91 PCT zulässig. Eine Korrektur ist nur dann zulässig, wenn (i) erkennbar ist, daß ein Fehler vorliegt und (ii) eindeutig ist. was beabsichtigt war. Die jeweils vorliegende grössere Lücke zwischen "71 000" und "3 000 Da" und "200 000" und "10 000 Da" und zwischen "des" und "-Typs" und zwischen "40" und "M" können als Hinweis auf einen Fehler gedeutet werden. Es ist jedoch nicht eindeutig, was in die Lücke gehört. Statt den nun geforderten Korrekturen zu "71 000 +/- 3 000 Da" und "200 000 +/- 10 000 Da", "des α-Typs" und "zwischen 40 μM und 100 mM" könnte man sich auch vorstellen, daß jeweils beabsichtigt war, daß zum Beispiel stattdessen "71 000 - 73 000 Da" und "200 000 - 210 000 Da", "des β-Typs" und "zwischen 40 mM und 100 mM" im Text beabsichtigt war. Zusammenfassend gilt. daß bei jeder der beantragten Korrekturen der Fehler offensichtlich war, aber die korrekte Version nicht eindeutig aus dem Zusammenhang hervorgeht. Daher sind die "korrigierten Seiten" 2, 3 und 6 unter Regel 91 PCT nicht zuzulassen. Die Prüfung wird auf der Basis der ursprünglich eingereichten Anmeldeunterlagen durchgeführt.

Zu_Punkt_V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Zitierte Dokumente und Zusammenfassung der Anmeldung

Der vorliegende Bescheid nimmt auf folgende, im internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumente (D) bezug. Die Nummerierung der Dokumente wird im weiteren Verfahren beibehalten.

D1: Bezakova et al. 2000: "Phospholipase D activity of poppy seedlings, Papaver somniferum L". Chemistry and physics of lipids Bd. 107, Nr. 1, Seite 22.

D2: Pappan und Wang 1999: "Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D". Biochimica et biophysica acta 1439, Seiten 151-166.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT

Die vorliegende Anmeldung betrifft eine Proteinfraktion mit Phospholipase D-Aktivität, die aus zwei Proteinunterfraktionen A und B besteht, wobei beide Unterfraktionen unterschiedliche Eigenschaften z.B. in Bezug auf ihr pH-Optimum haben. Es wird als erstaunlich angesehen, daß diese erfindungsgemässe Proteinfraktion nicht nur durch Calcium- sondern auch durch Zinkionen aktivierbar ist. Weitere als unerwartet angegebene Eigenschaften werden auf Seite 5, im ersten Absatz und auf Seite 7 im zweiten und dritten Absatz genannt. Da die Sequenz nicht bestimmt werden konnte (Seite 12, dritter Absatz), wird die Proteinfraktion durch Parameter charakterisiert.

D1 ist die Zusammenfassung eines Vortrags der Erfinder. Für die Methoden wird spezifisch auf Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen verwiesen. Das Vorliegen zweier unterschiedlicher Enzyme, deren Molekulargewichte und pH Optima und die Fähigikeit zur Hydrolyse und zur Transphosphatidylierung z.B. von Phosphatidylcholine werden offenbart.

D2 fasst den Stand der Technik für pflanzliche Phospholipase D zusammen. Insbesondere werden die Regulation durch Calciumionen und verschiedene Substrate einschliesslich Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol genannt.

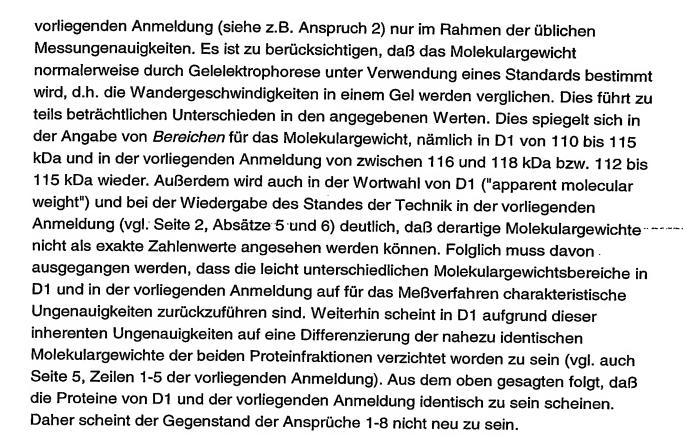
Neuheit 2.

Der Gegenstand der Ansprüche 1-10 ist nicht neu.

Die Ansprüche 1-8 beziehen sich auf eine Proteinfraktion mit Phospholipase D-2.1 Aktivität, die aus zwei Proteinunterfraktionen A und B besteht, wobei beide Unterfraktionen unterschiedliche Eigenschaften z.B. in Bezug auf ihr pH-Optimum haben. "Unerwartete" Eigenschaften dieser Proteinfraktion werden genannt (Seite 5, erster Absatz und Seite 7 zweiter und dritter Absatz).

D1 beschreibt eine Proteinfraktion aus demselben Organismus mit denselben Eigenschaften, d.h. auch die "unerwarteten" Effekte der vorliegenden Anmeldung, wie z.B. die Aktivierbarkeit durch Zinkionen. In D1 wird darauf hingewiesen, daß die Proteinfraktion aus zwei Unterfraktionen besteht, wobei die Unterfraktionen unterschiedliche hydrolytische Aktivitäten in Abhängigkeit vom pH Wert aufweisen. Die Angaben des Molekulargewichtes in D1 unterscheiden sich von den Angaben in der

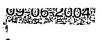
INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT



2.2 Die Ansprüche 9 und 10 beziehen sich auf die Verwendung der Proteinfraktion zur Hydrolyse und/oder Transphosphatylierung z.B. von Phosphatidylcholin. Da diese enzymatischen Aktivitäten in D1 bereits offenbart sind, muss die Verwendung dieser Aktivitäten als nicht neu angesehen werden.

3. Erfinderische Tätigkeit

Der Gegenstand des Anspruchs 11 ist nicht erfinderisch, da die allgemeine Aktivität der Proteinfraktion nämlich Hydrolyse und/oder Transphosphorylierung aus D1 bereits bekannt ist und Phosphatidylinosit als Substrat als willkürliche Auswahl der bekannten Substrate von Phospholipase D Enzymen angesehen werden muss (Zusammenfassung des Standes der Technik z.B. in D3, wobei die Substrate auf Seite 158, rechte Spalte bis Seite 159, erster Absatz der linken Spalte genannt werden).





Auch aus entfettetem Baumwollsamenmehl ist es gelungen, ein entsprechendes Enzym zu extrahieren.

Neben pflanzlichen Quellen dienen auch Mikroorganismen als Quelle, wobei insbesondere Corynebakterien (Corynebacterium ovis), Escherichia coli, Bäckerhefezellen und Streptomyceten (Streptomyces hachijoensis) zu nennen sind.

Phospholipase konnte aber auch aus Säugetierzellen isoliert werden, wie z. B. aus menschlichen Eosinophilen und Rattenhirnmikrosomen.

Hinsichtlich des Molekulargewichts bietet sich bezüglich der bekannten Phospholipasen D ein heterogenes Bild:

So weist das aus Baumwollsamen isolierte lösliche Enzym ein Molekulargewicht von 71 000 ± 3 000 Da auf; Phospholipase D aus Erdnusssamen besitzt ein Molekulargewicht von 200 000 ± 10 000 Da und PLD aus menschlichen Eosinophilen ein Molekulargewicht von ca. 60 000 Da.

20

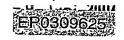
Entsprechende bakterielle Enzyme, wie sie bspw. aus Corynebacterium ovis isoliert werden können, besitzen ein Molekulargewicht von annähernd 90 000 Da.

Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes sind für Phospholipase D aus Erdnusssamen pl-Werte von 4,65 bekannt, wo hingegen der pl eines Rohextraktes aus menschlichen Eosinophilen zwischen 4,8 und 5,0 liegt und durch zusätzliche Aufreinigung einen Wert zwischen 5,8 und 6,2 annehmen kann.

30

Die Aufreinigung von PLD aus Weißkohl in zwei Schritten beschreibt R. Lambrecht et al ("A facile purification procedure of phospholipase D from





cabbage and its characterization"; (1992) Biol. Chem. Hoppe Seyler Vol 373 (2) 81-88). Diese Methode umfasst eine Ammoniumsulfat-Präzipitation und eine darauffolgende Ca*-vermittelte Affinitätschromatographie.

- 3 -

- Der Veröffentlichung von I. Schäffner et al ("Genomic structure, cloning and expression of two phopholipase D isoenzymes from white cabbage."; Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104, 79-87 (2002); entsprechend Dissertation (2001)) kann entnommen werden, wie rekombinante Phospholipase D-aktive lsoenzyme aus Weißkohl über Klonierungsverfahren erhalten werden können und wie man diese Isoenzyme hinsichtlich ihrer spezifischen Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Ca2+-Konzentration sowie hinsichtlich ihrer Transposphatidylierungseigenschaften charakterisieren kann.
- Einen aligemeinen Überblick zum Kenntnisstand bezüglich Phospholipase D gibt der Übersichts-Beitrag von Michael Heller in Advanced Lipid Research, 1978, Band 16, Seiten 267 bis 326.
- A. Lerchner et al beschreiben in "Identification of two isoenzymes of phospholipase D from opium poppy" (Direct submission (2001) NCBI GenBank, accessions nos. AAL48261 - AAK48264 und Multipler Sequenzvergleich) zwei trunkierte Phospholipase D1 Polypeptide sowie zwei weitere trunkierte Phospholipase D2 Polypeptide aus Papaver somniferum. Wie aus dem multiplen Sequenzvergleich entnommen werden kann, haben die Teilaminosäure-Sequenzen der Proteine D1 und D2 eine Sequenzidentität von 98% zueinander. Zudem besitzen die beschriebenen Teilsequenzen eine hohe Homologie (70-84%) zu den gut charakterisierten Phospholipase D-Varietäten des α -Typs. Da die Sequenz-Ermittlung am 5'-Ende nicht vollständig ist, ist es allerdings nicht möglich, die Phospholipase D1- und D2-Polypeptide einem definierten Enzym
- zuzuordnen.





5

10



Aktivitätsoptimum bei pH-Werten zwischen 5,0 und 6,0.

Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes kann durch weitere Aufreinigung isolierter Fraktionen ein definierter Wert erreicht werden.

Die Proteinfraktion der vorliegenden Erfindung ist aus diesem Grund auch insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass die Unterfraktion A einen isoelektrischen Punkt pl von 8,7 und eine Molekularmasse von 116,4 kDa sowie ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH 8,0 aufweist. Die entsprechenden bevorzugten Werte der Unterfraktion B betragen hinsichtlich der Molekularmasse 114,1 kDa, hinsichtlich des isoelektrischen Punktes pl 6,7 sowie ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum, das bei pH 5,5 liegt. Auch diese Merkmale werden von der vorliegenden Erfindung umfasst.

- Wie bereits angegeben, sind Proteinfraktionen mit Phospholipase D-Aktivität üblicherweise Calciumionen-abhängig. Diese ausgeprägte Abhängigkeit hat sich allerdings für die beanspruchte pflanzliche Proteinfraktion aus Papaveraceen, die zwingend Zn²+-Ionen aktivierbar ist, nicht bestätigt. Allerdings kann das Aktivitätsoptimum dieser Proteinfraktion auch in Gegenwart von Calcium-Ionenkonzentrationen erreicht werden, die dann üblicherweise zwischen 40 µM und 100 mM liegen, wobei entsprechende Enzymaktivitäten bei Konzentrationen zwischen 2 und 20 mM und zwischen 5 und 15 mM auftreten
- Bezüglich der Unterfraktion B beansprucht die vorliegende Erfindung eine Protein-Variante, deren Aktivierbarkeitsoptimum in Gegenwart von Zn²⁺- Ionenkonzentrationen auftritt, die zwischen 1,0 und 10 mM und besonders bevorzugt bei 5 mM liegen.
- Als u.a. erfindungswesentlich sieht die vorliegende Erfindung vor, dass die Unterfraktionen A und/oder B Kohlenhydratanteile aufweisen, so dass sie also in glykosylierter Form als N-verknüpfte Glykoproteine vorliegen, und



Translation

PATENT COOPERATION TREATY



PCT

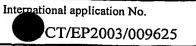
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

	(2-0-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-		
Applicant's or agent's file reference 30850P WO	FOR FURTHER ACTION	ON See Notific	cation of Transmittal of International Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP2003/009625	International filing date (a 29 August 2003 (2		Priority date (day/month/year) 30 August 2002 (30.08.2002)
International Patent Classification (IPC) or n C12N 9/16			
Applicant	DEGUSSA	AG	
This international preliminary exam and is transmitted to the applicant a	ination report has been precording to Article 36.	pared by this Intern	national Preliminary Examining Authority
2. This REPORT consists of a total of	6 sheets, inc	cluding this cover	sheet.
This report is also accompan amended and are the basis for 70.16 and Section 607 of the	or this report and/or sheets of	containing rectification	ion, claims and/or drawings which have been ations made before this Authority (see Rule
These annexes consist of a to	otal of she	ets.	
3. This report contains indications rel	ating to the following items	:	
I Basis of the report			
· II Priority			
III Non-establishment	of opinion with regard to n	ovelty, inventive s	step and industrial applicability
IV Lack of unity of in			
V Reasoned statemer citations and expla	nt under Article 35(2) with a mations supporting such sta	regard to novelty, i tement	inventive step or industrial applicability;
VI Certain documents	cited		
VII Certain defects in	the international application	ı	
	ns on the international appl	ication	
_		•	
Date of submission of the demand		Date of completion	of this report
			6 July 2004 (16.07.2004)
05 February 2004 (05.	02.2004)		O July 2001 (2010)
Name and mailing address of the IPEA/E	2	Authorized officer	
Facsimile No.		Telephone No.	

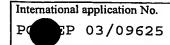


NARY EXAMINATION REPORT



	s of the rep	•
1. With		the elements of the international application:*
	the inter	mational application as originally filed
\boxtimes	the desc	cription:
	pages _	1, 4, 5, 7-15 , as originally filed
	pages _	, filed with the demand
	pages _	2, 3, 6 , filed with the letter of09 June 2004 (09.06.2004)
	the clain	ns:
	pages _	
	pages _	, as amended (together with any statement under Article 19
	pages _ pages	, filed with the demand
	_	, filed with the letter of
	the draw	
	pages _	, as originally filed
	pages _	, filed with the latter of
	-	, filed with the letter of
ا		nce listing part of the description:
ı	pages _	, as originally filed
	pages _ pages	, filed with the demand
-		, filed with the letter of
ւուշւ	se elements	o the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which all application was filed, unless otherwise indicated under this item. It is were available or furnished to this Authority in the following language which is:
	the lang	guage of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
닉	the langi	guage of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
	or 55.3).	
3. With preli	iminary exa	to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international amination was carried out on the basis of the sequence listing:
H		ed in the international application in written form.
H		gether with the international application in computer readable form.
H		ed subsequently to this Authority in written form.
H		ed subsequently to this Authority in computer readable form.
<u> </u>	internation	atement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the ional application as filed has been furnished.
<u></u>	The state been furn	tement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has rnished.
4.	The ame	endments have resulted in the cancellation of:
		he description, pages
	th th	he claims, Nos.
		he drawings, sheets/fig
5.	This repo beyond th	ort has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go he disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**
and 7	acement sh his report o 70.17).	heets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16
** Any r	eplacemen	nt sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PREIMINARY EXAMINATION REPORT



I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

Request for Correction of "Obvious Errors in Documents"

None of the requested corrections is admissible under PCT Rule 91. A correction is admissible only if (i) it can be determined that there is an error and (ii) it is clear what was intended. Each of the large spaces between. "71,000" and "3,000 Da", between "200,000" and "10,000 Da", between "of the" and "type" and between "40" and "M" can be seen to indicate an error. However, it is not clear what belongs within each space. Instead of making the currently requested corrections of "71,000 +/- 3,000 Da" and "200,000 +/- 10,000 Da" as well as "of the α type" and "between 40 μM and 100 m M", it is also conceivable that the passages were instead intended to read "71,000 to 73,000 Da" and "200,000 to 210,000 Da" as well as "of the β-type" and "between 40 mM and 100 mM". In summary, each of the requested corrections involves an obvious error, yet the correct version does not emerge clearly from the context. For this reason, the "corrected pages" 2, 3 and 6 are inadmissible under PCT Rule 91. The examination is accordingly carried out on the basis of the application as originally filed.

INTERNATIONAL PREMINARY EXAMINATION REPORT

International	application No.		
EP EP	03/09625		

v. `	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
	citations and explanations supporting such statement

Statement		•	
Novelty (N)	Claims	11	YES
	Claims	1-10	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

Citations and explanations

1. Cited documents and summary of the application

Reference is made in the present report to the following search report citations (D). The same numbering of the documents will be used throughout the procedure.

- D1: Bezakova et al., 2000: "Phospholipase D activity of poppy seedlings, Papaver somniferum L". Chemistry and physics of lipids, Vol. 107, No. 1, page 22.
- D2: Pappan and Wang, 1999: "Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D". Biochimica et biophysica acta, 1439, pages 151-166.

The present application relates to a protein fraction with phospholipase D activity, said fraction consisting of two protein sub-fractions A and B, the two sub-fractions having different properties, for example, in terms of their pH optimum. It is considered very surprising that the protein fraction according to the invention can be activated not only by calcium but also by zinc ions. Other properties that are considered unexpected are mentioned on page 5, first paragraph, and on page 7, second and third

paragraphs. Since the sequence could not be determined (page 12, third paragraph), the protein fraction is characterized by parameters.

Document D1 is the abstract of a presentation by the inventor. For the methods, specific reference is made to publications of other working groups. The document discloses the presence of two different enzymes, their molecular weights and pH optima and their ability to carry out the hydrolysis and the transphosphatidylation of e.g. phosphatidylcholines.

Document D2 summarizes the prior art for plant phospholipase D. In particular, this document mentions regulation by calcium ions and various substrates, including phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol.

2. Novelty

The subject matter of claims 1-10 is not novel.

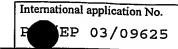
2.1. Claims 1-8 relate to a protein fraction with phospholipase D activity, said fraction consisting of two protein sub-fractions A and B, the two sub-fractions having different properties, for example, in terms of their pH optimum. "Unexpected" properties of these protein fractions are mentioned (page 5, first paragraph and page 7, second and third paragraphs).

Document D1 describes a protein fraction from the same organism with the same properties, i.e. the same "unexpected" effects as according to the present application, such as e.g. its ability to be activated by zinc ions. Reference is made in D1 to the fact that the

protein fraction consists of two sub-fractions, said subfractions having different hydrolytic activities depending on pH value. The statements of molecular weight in D1 differ from the statements made in the present application (see e.g. claim 2) only in terms of the precision of measurements. It should be taken into account that the molecular weight is normally determined by gel electrophoresis using a standard, in other words, the migration rates in a gel are compared. Such a method can result in some considerable differences in the values given. This can be seen in the statement of ranges for the molecular weight, namely from 110 to 115 kDa in document D1 and between 116 and 118 kDa and 112 to 115 kDa in the present application. Furthermore, the wording of D1 ("apparent molecular weight") and the description of the prior art in the present application (cf. page 2, paragraphs 5 and 6) also make it clear that molecular weights such as these cannot be regarded as exact numerical values. Accordingly, it must be assumed that the slightly different molecular weight ranges given in D1 and in the present application are the result of measuring inaccuracies that are characteristic of the measurement method. Moreover, based on these inherent inaccuracies, it does not appear that any attempt was made in D1 to differentiate between the nearly identical molecular weights of the two protein fractions (cf. also page 5, lines 1-5 of the present application). In light of the above, it follows that the proteins according to D1 and those according to the present application appear to be identical. Therefore, the subject matter of claims 1-8 does not appear novel.

2.2. Claims 9 and 10 relate to the use of the protein fractions for the hydrolysis and the transphosphatidylation of e.g. phosphatidylcholines. Since these enzymatic

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT



activities have already been disclosed in document D1, the use of said activities cannot be considered novel.

3. Inventive Step

The subject matter of claim 11 is not inventive, since the general activity of the protein fraction, namely hydrolysis and/or transphosphatidylation, is already known from document D1 and the use of phosphatidylinosite as a substrate must be considered a random selection from known substrates of phospholipase D enzymes (summary of the prior art e.g. in D3, where the substrates are mentioned on page 158, right-hand column, to page 159, first paragraph of the left-hand column).